

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



J1017 U.S. PRO
09/919891
08/02/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 38 050.6
Anmelddetag: 02. August 2000
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktien-
gesellschaft, Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Neue für das meth-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen
IPC: C 07 H, C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 15. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayer

Neue für das metH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das metH-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heptenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph

für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinannten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-
5 Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt,
15 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methion-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das meth-
Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
20 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.
25 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
5 Homocystein-Methyltransferase II aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
10 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
15 (i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid enthaltend die Nukleo-
20 tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
25 insbesondere Pendelvектор oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den
Vektor enthalten oder in denen das methH-Gen verstärkt
ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit 5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als 10 Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der 15 Sequenz mit der des Homocystein-Methyltransferase II-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, 20 die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit 25 einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es 30 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid
5 gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Homocystein-Methyltransferase II und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und
10 die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen
15 die für das methH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die
20 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

25 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer
30 Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 5 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Brevibacterium flavum ATCC14067
10 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020

(*) oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

- 15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Homocystein-Methyltransferase II (EC 2.1.1.13) kodierende methH-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- 20 Zur Isolierung des methH-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,

1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) 5 wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) 10 oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences 15 USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of 20 the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von 25 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen metH kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 30 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des metH-Genproduktes 35 dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID
5 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner
10 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar
15 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
20 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der
25 Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.
30 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
35 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991)

41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, 5 Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des methH-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

- 10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise 15 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer 20 der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom 25 integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei 30 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen 35 Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991), bei

Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

10 Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße methH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., 15 Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 20 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe 25 derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige 30 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), 35 pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73

(1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunigan und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem meth-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann beispielsweise für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 30 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

5 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),

- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),

- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),

- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)

- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),

15 • das für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur
20 Verstärkung des metH Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),

- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),

- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),

- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
5 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des metH-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

20 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik 25 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der

American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, 5 Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe 10 können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, 15 Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die 20 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben 25 genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

30 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert.

Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des metH-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem

Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, 5 Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, 10 Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, 15 Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA- 20 Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et 25 al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, 30 Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin 35 Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems

(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,

5 Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids

10 Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

15 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 3662 Basenpaaren, welches als methH-Gen bezeichnet wurde. Das methH-Gen kodiert für ein Protein von 1221 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das metH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000365 BT

10 <140>

<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4301

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (385)..(4047)

25 <223> metH-Gen

<400> 1

taagggtttt ggaggcattt gcccgcgaacc catcgctggt catcccggtt ttgcgcatgc 60

30 cacgttcgta ttcataacca atcgcgatgc cttgagccca ccagccactg acatcaaagt 120

tgtccacat gtgcggcgat atgtgggtgt gagtccaaga ggtggctttt acgtcgtcaa 180

gcaatttttag ccactcttcc cacggctttc cggtgccgtt gaggatagt tcaggggaca 240

35 tgcctgggtgt tgagccttgc ggagtggagt cagtcatgcg accgagacta gtggcgcttt 300

gcctgtgttg cttagggggc gttgaaaatg aactacgaat gaaaagttcg ggaattgtct 360

40 aatccgtact aagctgtcta caca atg tct act tca gtt act tca cca gcc 411
Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala
1 5cac aac aac gca cat tcc tcc gaa ttt ttg gat gcg ttg gca aac cat 459
His Asn Asn Ala His Ser Ser Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His
45 10 15 20 2550 gtg ttg atc ggc gac ggc gcc atg ggc acc cag ctc caa ggc ttt gac 507
Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp
30 35 4055 ctg gac gtg gaa aag gat ttc ctt gat ctg gag ggg tgt aat gag att 555
Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile
45 50 5560 ctc aac gac acc cgc cct gat gtg ttg agg cag att cac cgc gcc tac 603
Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr
60 65 70

	ttt gag gcg gga gct gac ttg gtt gag acc aat act ttt ggt tgc aac Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn 75 80 85	651
5	ctg ccg aac ttg gcg gat tat gac atc gct gat cgt tgc cgt gag ctt Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu 90 95 100 105	699
10	gcc tac aag ggc act gca gtg gct agg gaa gtg gct gat gag atg ggg Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly 110 115 120	747
15	ccg ggc cga aac ggc atg cgg cgt ttc gtg gtt ggt tcc ctg gga cct Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro 125 130 135	795
20	gga acg aag ctt cca tcg ctg ggc cat gca ccg tat gca gat ttg cgt Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg 140 145 150	843
	ggg cac tac aag gaa gca gcg ctt ggc atc atc gac ggt ggt ggc gat Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Asp 155 160 165	891
25	gcc ttt ttg att gag act gct cag gac ttg ctt cag gtc aag gct gcg Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala 170 175 180 185	939
30	gtt cac ggc gtt caa gat gcc atg gct gaa ctt gat aca ttc ttg ccc Val His Gly Val Gln Asp Ala Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro 190 195 200	987
35	att att tgc cac gtc acc gta gag acc acc ggc acc atg ctc atg ggt Ile Ile Cys His Val Thr Val Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly 205 210 215	1035
	tct gag atc ggt gcc gcg ttg aca gcg ctg cag cca ctg ggt atc gac Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp 220 225 230	1083
40	atg att ggt ctg aac tgc gcc acc ggc cca gat gag atg agc gag cac Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His 235 240 245	1131
45	ctg cgt tac ctg tcc aag cac gcc gat att cct gtg tcg gtg atg cct Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro 250 255 260 265	1179
50	aac gca ggt ctt cct gtc ctg ggt aaa aac ggt gca gaa tac cca ctt Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu 270 275 280	1227
55	gag gct gag gat ttg gcg cag gcg ctg gct gga ttc gtc tcc gaa tat Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr 285 290 295	1275
	ggc ctg tcc atg gtg ggt ggt tgt tgt ggc acc aca cct gag cac atc Gly Leu Ser Met Val Gly Gly Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile 300 305 310	1323

	cgt gcg gtc cgc gat gcg gtg gtt ggt gtt cca gag cag gaa acc tcc	1371
	Arg Ala Val Arg Asp Ala Val Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser	
	315 320 325	
5	aca ctg acc aag atc cct gca ggc cct gtt gag cag gcc tcc cgc gag	1419
	Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu	
	330 335 340 345	
10	gtg gag aaa gag gac tcc gtc gcg tcg ctg tac acc tcg gtg cca ttg	1467
	Val Glu Lys Glu Asp Ser Val Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu	
	350 355 360	
15	tcc cag gaa acc ggc att tcc atg atc ggt gag cgc acc aac tcc aac	1515
	Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn	
	365 370 375	
	ggt tcc aag gca ttc cgt gag gca atg ctg tct ggc gat tgg gaa aag	1563
	Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys	
20	380 385 390	
	tgt gtg gat att gcc aag cag caa acc cgc gat ggt gca cac atg ctg	1611
	Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu	
	395 400 405	
25	gat ctt tgt gtg gat tac gtg gga cga gac ggc acc gcc gat atg gcg	1659
	Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala	
	410 415 420 425	
30	acc ttg gca gca ctt ctt gct acc agc tcc act ttg cca atc atg att	1707
	Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile	
	430 435 440	
35	gac tcc acc gag cca gag gtt att cgc aca ggc ctt gag cac ttg ggt	1755
	Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly	
	445 450 455	
	gga cga agc atc gtt aac tcc gtc aac ttt gaa gac ggc gat ggc cct	1803
	Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro	
40	460 465 470	
	gag tcc cgc tac cag cgc atc atg aaa ctg gta aag cag cac ggt gcg	1851
	Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala	
	475 480 485	
45	gcc gtg gtt gcg ctg acc att gat gag gaa ggc cag gca cgt acc gct	1899
	Ala Val Val Ala Leu Thr Ile Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala	
	490 495 500 505	
50	gag cac aag gtg cgc att gct aaa cga ctg att gac gat atc acc ggc	1947
	Glu His Lys Val Arg Ile Ala Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly	
	510 515 520	
55	agc tac ggc ctg gat atc aaa gac atc gtt gtg gac tgc ctg acc ttc	1995
	Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe	
	525 530 535	
	ccg atc tct act ggc cag gaa acc agg cga gat ggc att gaa acc	2043
	Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr	
	540 545 550	

	atc gaa gcc atc cgc gag ctg aag aag ctc tac cca gaa atc cac acc Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr 555 560 565	2091
5	acc ctg ggt ctg tcc aat att tcc ttc ggc ctg aac cct gct gca cgc Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg 570 575 580 585	2139
10	cag gtt ctt aac tct gtg ttc ctc aat gag tgc att gag gct ggt ctg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu 590 595 600	2187
15	gac tct gcg att gcg cac agc tcc aag att ttg ccg atg aac cgc att Asp Ser Ala Ile Ala His Ser Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile 605 610 615	2235
20	gat gat cgc cag cgc gaa gtg gcg ttg gat atg gtc tat gat cgc cgc Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg 620 625 630	2283
25	acc gag gat tac gat ccg ctg cag gaa ttc atg cag ctg ttt gag ggc Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly 635 640 645	2331
30	gtt tct gct gcc gat gcc aag gat gct cgc gct gaa cag ctg gcc gct Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala 650 655 660 665	2379
35	atg cct ttg ttt gag cgt ttg gca cag cgc atc atc gac ggc gat aag Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys 670 675 680	2427
40	aat ggc ctt gag gat gat ctg gaa gca ggc atg aag gag aag tct cct Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro 685 690 695	2475
45	att gcg atc atc aac gag gac ctt ctc aac ggc atg aag acc gtg ggt Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly 700 705 710	2523
50	gag ctg ttt ggt tcc gga cag atg cag ctg cca ttc gtg ctg caa tcg Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser 715 720 725	2571
55	gca gaa acc atg aaa act gcg gtg gcc tat ttg gaa ccg ttc atg gaa Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu 730 735 740 745	2619
	gag gaa gca gaa gct acc gga tct gcg cag gca gag ggc aag ggc aaa Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys 750 755 760	2667
	atc gtc gtg gcc acc gtc aag ggt gac gtg cac gat atc ggc aag aac Ile Val Val Ala Thr Val Lys Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn 765 770 775	2715
	ttg gtg gac atc att ttg tcc aac aac ggt tac gac gtg gtg aac ttg Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu 780 785 790	2763

	ggc atc aag cag cca ctg tcc gcc atg ttg gaa gca gcg gaa gaa cac Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His 795 800 805	2811
5	aaa gca gac gtc atc ggc atg tcg gga ctt ctt gtg aag tcc acc gtg Lys Ala Asp Val Ile Gly Met Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val 810 815 820 825	2859
10	gtg atg aag gaa aac ctt gag gag atg aac aac gcc ggc gca tcc aat Val Met Lys Glu Asn Leu Glu Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn 830 835 840	2907
15	tac cca gtc att ttg ggt ggc gct gcg ctg acg cgt acc tac gtg gaa Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu 845 850 855	2955
20	aac gat ctc aac gag gtg tac acc ggt gag gtg tac tac gcc cgt gat Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp 860 865 870	3003
	gct ttc gag ggc ctg cgc ctg atg gat gag gtg atg gca gaa aag cgt Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg 875 880 885	3051
25	ggt gaa gga ctt gat ccc aac tca cca gaa gct att gag cag gcg aag Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys 890 895 900 905	3099
30	aag aag gcg gaa cgt aag gct cgt aat gag cgt tcc cgc aag att gcc Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala 910 915 920	3147
35	gcg gag cgt aaa gct aat gcg gct ccc gtg att gtt ccg gag cgt tct Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser 925 930 935	3195
40	gat gtc tcc acc gat act cca acc gcg gca cca ccg ttc tgg gga acc Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr 940 945 950	3243
	cgc att gtc aag ggt ctg ccc ttg gcg gag ttc ttg ggc aac ctt gat Arg Ile Val Lys Glu Leu Pro Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp 955 960 965	3291
45	gag cgc gcc ttg ttc atg ggg cag tgg ggt ctg aaa tcc acc cgc ggc Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly 970 975 980 985	3339
50	aac gag ggt cca agc tat gag gat ttg gtg gaa act gaa ggc cga cca Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro 990 995 1000	3387
55	cgc ctg cgc tac tgg ctg gat cgc ctg aag tct gag ggc att ttg gac Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp 1005 1010 1015	3435
	cac gtg gcc ttg gtg tat ggc tac ttc cca gcg gtc gcg gaa ggc gat His Val Ala Leu Val Tyr Gly Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp 1020 1025 1030	3483

	gac gtg gtg atc ttg gaa tcc ccg gat cca cac gca gcc gaa cgcc atg Asp Val Val Ile Leu Glu Ser Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met 1035 1040 1045	3531
5	cgc ttt agc ttc cca cgc cag cag cgc ggc agg ttc ttg tgc atc gcg Arg Phe Ser Phe Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala 1050 1055 1060 1065	3579
10	gat ttc att cgc cca cgc gag caa gct gtc aag gac ggc caa gtg gac Asp Phe Ile Arg Pro Arg Glu Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp 1070 1075 1080	3627
15	gtc atg cca ttc cag ctg gtc acc atg ggt aat cct att gct gat ttc Val Met Pro Phe Gln Leu Val Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe 1085 1090 1095	3675
20	gcc aac gag ttg ttc gca gcc aat gaa tac cgc gag tac ttg gaa gtt Ala Asn Glu Leu Phe Ala Ala Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val 1100 1105 1110	3723
	cac ggc atc ggc gtg cag ctc acc gaa gca ttg gcc gag tac tgg cac His Gly Ile Gly Val Gln Leu Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp His 1115 1120 1125	3771
25	tcc cga gtg cgc agc gaa ctc aag ctg aac gac ggt gga tct gtc gct Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser Val Ala 1130 1135 1140 1145	3819
30	gat ttt gat cca gaa gac aag acc aag ttc ttc gac ctg gat tac cgc Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys Thr Lys Phe Phe Asp Leu Asp Tyr Arg 1150 1155 1160	3867
35	ggc gcc cgc ttc tcc ttt ggt tac ggt tct tgc cct gat ctg gaa gac Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly Tyr Gly Ser Cys Pro Asp Leu Glu Asp 1165 1170 1175	3915
40	cgc gca aag ctg gtg gaa ttg ctc gag cca ggc cgt atc ggc gtg gag Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu Glu Pro Gly Arg Ile Gly Val Glu 1180 1185 1190	3963
	ttg tcc gag gaa ctc cag ctg cac cca gag cag tcc aca gac gcg ttt Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu His Pro Glu Gln Ser Thr Asp Ala Phe 1195 1200 1205	4011
45	gtg ctc tac cac cca gag gca aag tac ttt aac gtc taacaccctt Val Leu Tyr His Pro Glu Ala Lys Tyr Phe Asn Val 1210 1215 1220	4057
50	gagagggaaa actttcccgac acattgcaga tcgtgccact ttaactaagg ttgacggcat gattaaggcg attttctggg acatggacgg cacgatggtg gactctgagc cacagtgggg cattgctacc tacgagctca gcgaaagccat gggccgcccgc ctcaccccg agctccggga actcaccgtc ggctcgagcc tgccgcgcac catgcgccta tgcgcaagagc acgcaggcat taca	4117 4177 4237 4297 4301

<210> 2
<211> 1221
<212> PRT
5 <213> Corynebacterium glutamicum

10 <400> 2
Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
1 5 10 15

15 10 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala
20 25 30

Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe
35 40 45

15 Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp
50 55 60

20 Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu
65 70 75 80

Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr
85 90 95

25 Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val
100 105 110

Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg
115 120 125

30 Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu
130 135 140

35 Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Asp Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala
165 170 175

40 Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala Val His Gly Val Gln Asp Ala
180 185 190

Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro Ile Ile Cys His Val Thr Val
195 200 205

45 Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu
210 215 220

50 Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala
225 230 235 240

Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His
245 250 255

55 Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu
260 265 270

Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln
275 280 285

Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Met Val Gly Gly
 290 295 300

Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile Arg Ala Val Arg Asp Ala Val
 5 305 310 315 320

Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala
 325 330 335

10 Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu Val Glu Lys Glu Asp Ser Val
 340 345 350

Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser
 15 355 360 365

Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu
 370 375 380

20 Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln
 385 390 395 400

Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val
 405 410 415

25 Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala
 420 425 430

Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val
 30 435 440 445

Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser
 450 455 460

35 Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile
 465 470 475 480

Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile
 485 490 495

40 Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala
 500 505 510

Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys
 45 515 520 525

Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu
 530 535 540

Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu
 50 545 550 555 560

Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 565 570 575

55 Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe
 580 585 590

Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser
 595 600 605

Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val
610 615 620

Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
5 625 630 635 640

Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys
645 650 655

Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
10 660 665 670

Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
675 680 685

Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
15 690 695 700

Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
20 705 710 715 720

Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
725 730 735

Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
25 740 745 750

Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
755 760 765

Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
30 770 775 780

Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser
35 785 790 795 800

Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
805 810 815

Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
40 820 825 830

Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
45 835 840 845

Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
850 855 860

Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu
50 865 870 875 880

Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn
885 890 895

Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala
55 900 905 910

Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala
915 920 925

Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro
930 935 940

5 Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro
945 950 955 960

Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly
965 970 975

10 Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu
980 985 990

Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp
995 1000 1005

15 Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp His Val Ala Leu Val Tyr Gly
1010 1015 1020

Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp Asp Val Val Ile Leu Glu Ser
20 025 1030 1035 1040

Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met Arg Phe Ser Phe Pro Arg Gln
1045 1050 1055

25 Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala Asp Phe Ile Arg Pro Arg Glu
1060 1065 1070

Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp Val Met Pro Phe Gln Leu Val
30 1075 1080 1085

Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe Ala Asn Glu Leu Phe Ala Ala
1090 1095 1100

Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val His Gly Ile Gly Val Gln Leu
35 105 1110 1115 1120

Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp His Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu
1125 1130 1135

40 Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser Val Ala Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys
1140 1145 1150

Thr Lys Phe Phe Asp Leu Asp Tyr Arg Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly
45 1155 1160 1165

Tyr Gly Ser Cys Pro Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu
1170 1175 1180

Leu Glu Pro Gly Arg Ile Gly Val Glu Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu
50 1185 1190 1195 1200

His Pro Glu Gln Ser Thr Asp Ala Phe Val Leu Tyr His Pro Glu Ala
1205 1210 1215

55 Lys Tyr Phe Asn Val
1220

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus
5 der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
20 eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
25 Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
30 genetischen Kodes entspricht, oder

- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
- 5 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneform Bakterien, in denen das methH-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
- 10 8. Als Wirtszelle dienende coryneform Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das methH-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
5
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das metH-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
10
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das metH-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
15
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid metH kodiert.
20
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
25
- 15.1 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
30 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,

- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi
- 5 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA
- 15.7 das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB
- 10 15.8 das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA
- 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierende Gen metY
- 15 verstärkt bzw. überexprimiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
20 coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB
- 25 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA
- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC

- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh
- 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck
- 5 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi
- 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
abschwächt.
- 10 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 15 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des Homocystein-Methyltransferase II Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass man die 20 Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

Neue für das metH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
5 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
20 denen zumindest das metH-Gen verstärkt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.